

VU Research Portal

Determinants of antifolate and 5-fluorouracil efficacy

Mauritz, R.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Mauritz, R. (2011). *Determinants of antifolate and 5-fluorouracil efficacy*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Dit proefschrift gaat over factoren die van invloed zijn op de werkzaamheid van antifolaten en 5-fluorouracil. Antifolaten zijn medicijnen die gebruikt worden bij de behandeling van kanker. Het is een groep van middelen die afgeleid zijn van foliumzuur, een van de B-vitamines. Foliumzuur wordt in het lichaam omgezet in allerlei verwante stoffen die gezamenlijk aangeduid worden als folaten. Antifolaten lijken op folaten maar hebben juist een remmend effect op allerlei belangrijke processen die plaatsvinden in de cel, waardoor de cellen dood gaan. Het meest bekende antifolaat is methotrexaat dat naast toepassing als medicijn tegen kanker (onder meer leukemie) ook gebruikt wordt bij andere ziektes zoals reuma.

Ook 5-fluorouracil (afgekort als 5-FU) is een antikankermiddel. Het is een remmer van het enzym thymidylaatsynthase (TS), waardoor de aanmaak van deoxythymidine monofosfaat, een essentieel bestanddeel van DNA, wordt geremd.

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding over de stofwisseling van folaten en antifolaten. Een belangrijk probleem bij de behandeling met antikankermiddelen is het optreden van resistentie (ongevoeligheid voor het medicijn). De meest belangrijke oorzaken van het ontstaan van resistentie tegen methotrexaat worden beschreven en er wordt een overzicht gegeven van kenmerken van andere antifolaten. De bespreking van 5-fluorouracil en andere fluoropyrimidines is beperkt omdat diverse eigenschappen van deze antikankermiddelen uitgebreid besproken worden in hoofdstuk 6.

Hoofdstuk 2 beschrijft de validatie van een test, de zogenaamde *in situ* TS remmingstest, als een instrument om het effect van methotrexaat en andere antifolaten tegen tumorcellen van kinderen met leukemie te beoordelen. In leukemie cellijnen vonden we een goede correlatie tussen de antifolaat-gevoeligheid zoals gemeten met de *in situ* TS remmingstest en de gevoeligheid zoals die blijkt uit celgroei remming gegevens, de gouden standaard. Vervolgens konden we, door gebruik te maken van deze *in situ* TS remmingstest, de gevoeligheid van leukemiecellen voor antifolaten bepalen. Door zowel een korte als een lange duur van blootstelling aan de antifolaten te gebruiken, kon een inschatting gemaakt worden hoe lang de verschillende antifolaten in de cel blijven. Dit is een indicatie is voor de mate van polyglutamylering, een proces waarbij het (anti)folaat molecuul een steeds langere staart krijgt. Deze studie was de basis voor verder onderzoek in ons laboratorium naar resistentie mechanismen tegen methotrexaat bij kinderleukemie.

Hoofdstuk 3 gaat over een mutatie (verandering) in het gen voor de zogenaamde reduced folate carrier (RFC), het belangrijkste transport-eiwit van folaten en antifolaten. Deze mutatie veroorzaakt resistentie tegen methotrexaat en andere antifolaten. Eerder waren alleen mutaties beschreven die leiden tot een verstoorde productie van RFC-eiwit door voortijdige beëindiging van de translatie. Wij konden als eerste aantonen dat een mutatie in het RFC-gen resulteerde in significante veranderingen in de kinetiek van het RFC-gemedieerde transport van folaten en antifolaten. Deze mutatie leidt tot een

structurele verandering in het RFC-eiwit: een sterk verhoogde affiniteit voor het transport van zowel foliumzuur als gereduceerde folaten, terwijl de affiniteit voor MTX onveranderd is. Wanneer cellen met deze RFC mutatie gekweekt worden onder standaard celkweek condities (met een hoge concentratie folaat in het medium) kan dit leiden tot een zodanig hoge mate van intracellulaire accumulatie van folaten dat dit resistentie tegen MTX, andere polyglutamylering-afhankelijke antifolaten en lipofiele DHFR-remmers veroorzaakt.

In de studie beschreven in **hoofdstuk 4** hebben we mechanismen onderzocht die ten grondslag liggen aan de verworven resistentie van humane leukemie cellijnen voor een panel antifolaten. Deze cellijnen werden verkregen door blootstelling aan de antifolaten in schema's die klinisch relevant zijn.

Intermitterende blootstelling van leukemie cellijnen aan methotrexaat, raltitrexed, pemetrexed en lometrexol resulteerde in een opvallend snelle ontwikkeling van resistentie ten gevolge van een verminderde polyglutamylering van deze antifolaten. Deze snelle ontwikkeling van resistentie kan worden veroorzaakt door selectie van (bestaande) klonen met verminderde activiteit van folylpolyglutamate synthetase (FPGS).

Cellen die zijn geselecteerd door voortdurende blootstelling aan GW1843U89 werden gekenmerkt door onwerkzaam RFC-transport, hetgeen resulteerde in een hoge mate van resistentie voor methotrexaat en andere RFC-transport afhankelijke antifolaten. De moleculaire basis hiervoor bleek te bestaan uit een structureel veranderd RFC-eiwit met verminderde methotrexaat transport capaciteit en verhoogd transport van foliumzuur, resulterend in intracellulaire accumulatie van folaten.

Hoofdstuk 5 behandelt de dynamiek van membraan transport van een reeks antifolaten via de RFC en/of de membraan folaat receptor (MFR) in zowel *in vitro* als *in vivo* muismodellen van leukemie. De potentie van de antifolaten op basis van de gemeten mate van *in situ* TS inhibitie, bleek sterk samen te hangen met de relatieve affiniteit van het betreffende antifolaat voor de RFC en de MFR. De DHFR-remmers methotrexaat en edatrexate vertoonden sterke antileukemische activiteit in muizen die geïnoculeerd waren met leukemie cellen met RFC expressie. Dit effect werd versterkt door folaat-beperking in de voeding van de muizen, waarschijnlijk door verminderde competitie om opname door de cellen en om polyglutamylering door circulerende folaten in bloed.

Hoofdstuk 6 geeft een overzicht van de farmacogenetische aspecten van darmkanker; met name de potentiële betekenis voor de behandeling van darmkanker met 5-fluorouracil en analogen daarvan wordt besproken.

In de studie beschreven in **hoofdstuk 7** onderzochten we het effect van 5-fluorouracil op mRNA concentraties van thymidylate synthase (TS) en dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in tumorweefsel van patiënten met darmkanker. In *in vitro* studies is TS inductie niet gerelateerd aan veranderingen in mRNA. Echter, de studies in patiëntenmateriaal lieten een stijging in TS mRNA concentratie na 5-fluorouracil

toediening zien. Daarnaast vonden we dat 5-fluorouracil toediening leidt tot een vermindering van dihydropyrimidine dehydrogenase. Deze bevinding is in lijn met eerdere publicaties; het mechanisme wat eraan ten grondslag ligt blijft echter onopgehelderd.

Ten slotte beschrijft **hoofdstuk 8** een studie waarbij polymorfismen (laag frequent voorkomende mutaties) in het TS-gen die eerder gerelateerd waren aan *in vitro* TS-expressie onderzocht zijn in weefselmonsters van patiënten met darmkanker. We vonden geen correlatie tussen het TS genotype en TS mRNA expressie en TS eiwit concentraties in kwaadaardige weefsels. Echter, normale weefsels met het betreffende TS polymorfisme werden gekenmerkt door een hogere TS eiwit expressie en een hogere TS enzym activiteit in vergelijking tot weefsels met het normale (“wild type”) genotype. Mogelijk kan bepaling van het TS polymorfisme helpen bij het voorspellen van de toxiciteit van TS-remmers als 5-fluorouracil.

Belangrijkste conclusies van dit proefschrift

- De TS *in situ* assay kan worden gebruikt voor snelle screening van antifolaat gevoeligheid van leukemie cellen van kinderen met leukemie.
- Resistentie (ongevoeligheid) voor methotrexaat (en andere antifolaten) kan worden geassocieerd met een structureel veranderd RFC eiwit met verminderde MTX transport capaciteit en toegenomen transport van natuurlijke folaten. Als gevolg hiervan zullen hoge extracellulaire folaat concentraties leiden tot sterk verhoogde intracellulaire folaat voorraden en resulteren in resistentie tegen meerdere antifolaten.
- Multifactoriële mechanismen die resistentie tegen antifolaten in CEM cellen veroorzaken beïnvloeden de cellulaire folaat-huishouding: verminderde polyglutamylering en transport-defecten leiden tot depletie van folaat, terwijl een structureel veranderd RFC eiwit de intracellulaire folaat voorraden kan vergroten.
- De behandeling van darmkanker met 5-FU beïnvloedt TS en DPD gen expressie *in vivo*.
- TSER polymorfismen voorspellen TS concentraties in normale weefsels maar niet TS concentraties in darmkankerweefsel. Als zodanig kunnen deze polymorfismen waardevol zijn in het voorspellen van de toxiciteit van TS-gerichte behandeling.